

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS**

**Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia**



# **GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE** **AULA**

## **QUÍMICA BIOLÓGICA**

**Carreras: Profesorado en Biología**

**(Plan 10/00)**

**Licenciatura en Cs. Biológicas**

**(Plan 08/13)**

***Equipo Docente***

**Profesores Responsables: Alicia Molina- Ana Cecilia  
Anzulovich**

**Jefes de Trabajos Prácticos: Yamila Carmona Viglianco-  
Rebeca Golini**

**Auxiliar: Daniela Pardo**

**2018**

La presente Guía de Trabajos Prácticos pertenece al curso de Química Biológica, del segundo año de las carreras de Licenciatura en Ciencias Biológicas y Profesorado en Biología.

Este curso obligatorio corresponde al ciclo básico, posee un crédito horario de 8 h semanales (3 h de clases teóricas, 2 h de Trabajos Prácticos de Aula y 3 h de Trabajos Prácticos de Laboratorio), y un total de 110 h que se dictan en el primer cuatrimestre del año.

Para el **cursado** de Química Biológica, de acuerdo a lo estipulado en los planes 010/00 (Profesorado en Biología) y 08/13 (Lic en Cs Biológicas), es necesario tener ***aprobados*** los cursos de Biología General y Química General e Inorgánica y ***regularizado*** el curso de Química Orgánica. Para **rendir** el curso de Química Biológica se requiere tener ***aprobado*** el curso de Química Orgánica.

Durante el desarrollo del curso el alumno adquirirá conocimientos sobre:

1- Enzimas: se realizará un estudio sobre las propiedades generales, las características cinéticas y los mecanismos de regulación de las enzimas.

2- Los procesos de obtención de energía metabólica y su utilización en los distintos procesos biológicos.

3-El metabolismo celular: se estudiarán las vías metabólicas de degradación y de biosíntesis, las reacciones enzimáticas fundamentales y sus mecanismos de regulación.

Los docentes encargados del dictado de este curso son: Dra. Alicia Molina (Profesora Responsable del dictado de la materia para la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas y Profesora Colaboradora para la carrera de Profesorado en Biología), Dra. Ana Cecilia Anzulovich (Profesora Responsable del dictado de la materia para la carrera de Profesorado en Biología y Profesora Colaboradora del dictado para la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas), Dra. Yamila Carmona Viglianco (Jefe de Trabajos Prácticos), Dra. Rebeca Golini (Jefe de Trabajos Prácticos).

## ÍNDICE

### ***TRABAJO PRÁCTICOS DE AULA***

REGLAMENTO .....	4
CRONOGRAMA (Lic. en Cs. Biológicas y Prof. En Biología).....	6
TRABAJO PRÁCTICO N° 1: ENZIMAS.....	12
TRABAJO PRÁCTICO N° 2: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL- FOSFORILACIÓN OXIDATIVA .....	21
TRABAJO PRÁCTICO N° 3: TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO EN CLOROPLASTOS- FOTOFOSFORILACIÓN .....	33
TRABAJO PRÁCTICO N° 4: METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS VÍA GLICOLÍTICA .....	42
TRABAJO PRÁCTICO N° 5: CICLO DE KREBS. VÍA DE LAS PENTOSAS. CICLO DEL GLIOXILATO.....	51
TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6: SÍNTESIS FOTOSINTÉTICA DE GLÚCIDOS EN VEGETALES REACCIONES DE FIJACIÓN DEL CARBONO .....	64
TRABAJO PRÁCTICO N° 7 y 8: BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	72
TRABAJO PRÁCTICO N° 9: DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS .....	84
TRABAJO PRÁCTICO N° 10: METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS.....	95
BIBLIOGRAFÍA .....	110

## REGLAMENTO DE TRABAJOS PRÁCTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES

### ALUMNOS REGULARES

1. Los alumnos conocerán, al comenzar el cuatrimestre, las fechas y los temas de los trabajos prácticos de aula y de laboratorio, como así también las fechas de las Evaluaciones Parciales. Todo lo mencionado será informado en el avisador de la asignatura.
2. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se encontrará desarrollada en las clases teóricas así como en la guía de trabajos prácticos.
3. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.
4. Los conocimientos del alumno sobre la fundamentación teórica de los Trabajos Prácticos, serán evaluados antes, durante, o al final del desarrollo de los mismos.
5. Cada alumno llevará un cuaderno o carpeta en el que consignará los resultados y observaciones, a la manera de informe de los Trabajos Prácticos realizados. Al final de cada jornada el Jefe de Trabajos Prácticos podrá revisar y constatar los resultados obtenidos.
6. Para la aprobación de los Trabajos Prácticos el alumno deberá obtener resultados adecuados, responder satisfactoriamente las preguntas y cuestionarios de trabajos prácticos, y para ser considerado alumno regular en el curso deberá aprobar las Evaluaciones Parciales programadas y haber asistido al menos al 60% de las clases teóricas.
7. De acuerdo a la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03 y su modificatoria Ord. N° 32/14) los alumnos deberán aprobar el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y de las Evaluaciones Parciales sobre los mismos.
8. Por las mismas reglamentaciones, los alumnos tendrán dos (2) oportunidades de recuperación de los Trabajos Prácticos de laboratorio y aula, debiendo aprobar en primera instancia el 75% (o su fracción menor) de los trabajos prácticos completando la aprobación del noventa por ciento (90%) en la primera recuperación. En la segunda recuperación deberá totalizar la aprobación del cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos.
9. Para poder rendir cada evaluación parcial, los alumnos deberán tener aprobado el ciento por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyos contenidos se evalúan en dicha evaluación. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales y se aprobarán con el 65% del puntaje total.
10. Teniendo en cuenta la Ord. N° 32/14, para ser considerado como alumno regular se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de publicado el resultado del Parcial. La segunda recuperación se realizará al final del cuatrimestre. Ambas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.

## ALUMNOS CON PROMOCIÓN SIN EXÁMEN FINAL

Este Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación por Promoción sin examen final. Para acceder a dicha Promoción los alumnos deberán:

- a- En el momento de inscribirse al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el plan de estudio para rendir el examen final de esta asignatura.
- b- Cumplir con la asistencia al 80% de las clases teóricas.
- c- Aprobar los trabajos prácticos de laboratorio y aula con igual exigencia que los alumnos regulares.
- d- Aprobar cada evaluación parcial con el 70% de los temas de la condición regular más el 70% de los contenidos propios de la condición promocional.
- e- Aprobar una evaluación adicional, de modalidad individual, escrita u oral, sobre los temas restantes para completar el programa de la asignatura
- f- Los alumnos que opten por la Promoción sin examen final tendrán solo dos (2) recuperaciones para todas las evaluaciones Parciales. Estas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.
- g- Pérdida de la promoción: en el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el alumno será considerado regular si cumple con las respectivas condiciones de regularidad.
- h- La nota final de la materia será igual al promedio de las calificaciones obtenidas en todas las evaluaciones.

<b>PROF. Y LIC. EN CS. BIOLÓGICAS</b> <b>QUÍMICA BIOLÓGICA - 2018</b> <b>CRONOGRAMA DE TEORÍAS, TP DE AULA y LABORATORIO</b>			
<b>FECHA</b>	<b>Lun 18-20 h (Aula 43)</b> <b>Jue 18-20 h (Aula 37)</b> <b><u>TEORIAS</u></b>	<b>MAR 11-13 h</b> <b>(Aula 41)</b>  <b><u>TP AULA</u></b>	<b>JUE 10- 13 h</b> <b>LabQca Biológica</b> <b>1° Piso- Bloque 1</b>  <b><u>TP LABORATORIO</u></b>
<b>MARZO</b>			
LUN 12	<b>INSCRIPCION</b> 10:00-12:00h Laboratorio		
MAR 13			
JUE 15	ENZIMAS I (Bol 1) CONCEPTOS DE METABOLISMO (Bol 2)		
LUN 19	ENZIMAS II (cont Bol 1) ENZIMAS DE OXIDORREDUCCION.		
MAR 20		<b>TP AULA N° 1:</b> <b>ENZIMAS</b>	
JUE 22	CADENA RESPIRATORIA (cont Bol 2)		<b>LAB N° 1:</b> -Bioseguridad y manejo de instrumental -Curva de calibración
LUN 26	TRANSPORTE ELECTRONICO FOTOINDUCIDO (cont Bol 2)		
MAR 27		<b>TP AULA N° 2:</b> <b>TRANSPORTE</b> <b>ELECTRÓNICO</b> <b>MITOCONDRIAL</b>	
JUE 29	<b>FERIADO</b>		

ABRIL			
LUN 02	<b>FERIADO</b>		
MAR 03		<b>TP AULA N° 3:</b> TRANSPORTE ELECTRÓNICO FOTOINDUCIDO	
JUE 05	Metabolismo de Hidratos de Carbono: DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN (Bol 3)		<b>LAB N° 2:</b> Enzimas: variables que modifican la velocidad de reacción
LUN 9	Metabolismo de Hidratos de Carbono: VIA GLICOLÍTICA		
MAR 10		<b>TP AULA N° 4:</b> METAB H de C: VÍA GLICOLÍTICA	
JUE 12	CICLO DE KREBS (Bol4)		<b>LAB N° 3:</b> Transporte Electrónico Mitocondrial
LUN 16	Metabolismo de Hidratos de Carbono: VIA de LAS PENTOSAS (cont Bol 4) <b>Consulta 1° Parcial</b>		
MAR 17		<b>(Consulta 1° Parcial TP Aula)</b>	
JUE 19	Metabolismo de Hidratos de Carbono: GLUCONEOGÉNESIS (contBol4)		<b>LAB N° 4:</b> Transporte Electrónico Fotoinducido

LUN 23	<b>PRIMER PARCIAL</b> <i>(Enzimas – Cadena Respiratoria – Fosforilación en Mitocondria y Cloroplasto)</i> Lugar: laboratorio Hora: 10-12  <b>TEORIA:</b> BIOSÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS METABOLISMO DE GLUCOGENO Y ALMIDÓN (Bol 5) -Lugar y hora establecido-		
MAR 24		<b>TP AULA N° 5:</b> <b>CICLO KREBS - VIA PENTOSAS</b>	
JUE 26	FOTOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS EN VEGETALES I (cont Bol 5)		<b>LAB. N° 5</b> Metab H de Carbono: Efecto Pasteur
LUN 30	<b>FERIADO</b>		
<b>MAYO</b>			
MAR 1	<b>FERIADO</b>		
JUE 3	<b>FERIADO</b>		
LUN 7	FOTOSÍNTESIS DE GLÚCIDOS EN VEGETALES II (cont Bol 5)		
MAR 8		<b>TP AULA N° 6:</b> <b>FOTOSÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS-GLUCONEOGÉNESIS</b>	
JUE 10	<b>FERIADO</b>		

LUN 14	DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS (Bol 6) <b>Consulta para 2º parcial</b>		
MAR 15		<b>SEGUNDO PARCIAL</b> <i>(Metabolismo Hidratos de Carbono, Vía Glicolítica, Ciclo de Krebs, Vía Pentosas, Síntesis de Hidratos de Carbono en vegetales)</i>	
JUE 17	DEGRADACIÓN DE ACIDOS GRASOS – CICLO DEL GLIOXILATO (cont. Bol 6 )		
LUN 21	BIOSÍNTESIS DE ACIDOS GRASOS 1 (Bol7)		
MAR 22		<b>TP AULA N° 7:</b> DEGRADACIÓN ACIDOS GRASOS. CETOGENESIS CETOSIS	
JUE 24	BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS 2 (Bol7)		<b>TP AULA N° 8:</b> BIOSÍNTESIS ÁCIDOS GRASOS (cont)
LUN 28	DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS-METAB. DE AMINOÁCIDOS (Bol 8) <b>Consulta para 3º parcial</b>		
MAR 29		<b>TERCER PARCIAL</b> <i>(Metabolismo de Lípidos)</i>	

JUE 31	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS (Cont Bol 8)		
<b>JUNIO</b>			
LUN 04	METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS (Bol 9) <b>Consulta para 4º parcial</b>		
MAR 05		<b>TP AULA N° 9: METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS</b>	
JUE 07	INTERRELACIONES METABÓLICAS 1 (Bol 10).		<b>TP AULA N° 10: METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS</b>
LUN 11	INTERRELACIONES METABÓLICAS 2 (cont.Bol 10)		
MAR 12	----	----	----
JUE 14	<b>INMUNOQUÍMICA I</b> <b><u>(Sólo Lic Cs Biol)</u></b>		
LUN 18	<b>INMUNOQUÍMICA II</b> <b><u>(Sólo Lic Cs Biol)</u></b>		
MAR 19		<b><u>CUARTO PARCIAL</u></b> <b>(Metabolismo de Aminoácidos Metabolismo de Nucleótidos)</b>	
JUE 21			<b>1º Recuperación Parciales</b>
VIE 22	<b>1º Recuperación Parciales</b>		

LUN 25	INTERRELACIONES METABÓLICAS (EXPOSICIÓN DE PROBLEMAS) <b>solo promocionales</b>	<b>1°Recuperación Parciales</b>	
MAR 26		<b>1°Recuperaciones de Parciales</b>	
MIE 27	<b>2°Recuperaciones de Parciales</b>		
JUE 28			<b>2° Recuperación de Parciales</b>

## T.P. DE AULA N° 1

### ENZIMAS

#### OBJETIVOS

- Conocer las distintas formas de determinar la actividad enzimática y los factores que la modifican.
- Conocer la naturaleza y función de las enzimas reguladoras.
- Reconocer la aplicación de las enzimas como marcadoras de normalidad o alteración de los procesos metabólicos.

#### INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos indispensables en la regulación de la bioquímica de células y organismos. Sin catálisis, las reacciones químicas necesarias para mantener la vida no podrían darse en una escala de tiempo conveniente. Para una bacteria que se reproduce cada veinte minutos, o para una célula nerviosa de un vertebrado que responde a un estímulo de forma instantánea, una reacción que demande muchas horas para completarse no sería útil.

Las enzimas se han convertido en herramientas prácticas importantes. Numerosas áreas de la Biología se han beneficiado con la aplicación de los análisis enzimáticos. Son útiles, por ejemplo en el estudio de las vías metabólicas de los distintos organismos y pueden advertir del estado de normalidad así como también de situaciones fuera del mismo.

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores y condiciones requeridos para la reacción.

A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir, aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el sustrato total presente de la mezcla.

Para medir la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones:

La cantidad de enzima se indica habitualmente en **Unidades Internacionales**.

Una **Unidad** de cualquier **enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ( $1\mu\text{mol} = 10^{-6}\text{mol}$ ) de sustrato por minuto bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado}}{\text{min}}$$

La **actividad específica** indica la pureza relativa de una preparación enzimática y relaciona la actividad enzimática no ya al volumen de la muestra, sino al total de proteínas existentes en la misma.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado/min. (Unidad de enzima)}}{\text{mg de proteínas}}$$

Un aumento de la actividad específica indicará que se han ido eliminando proteínas que no tienen la acción catalítica perseguida.

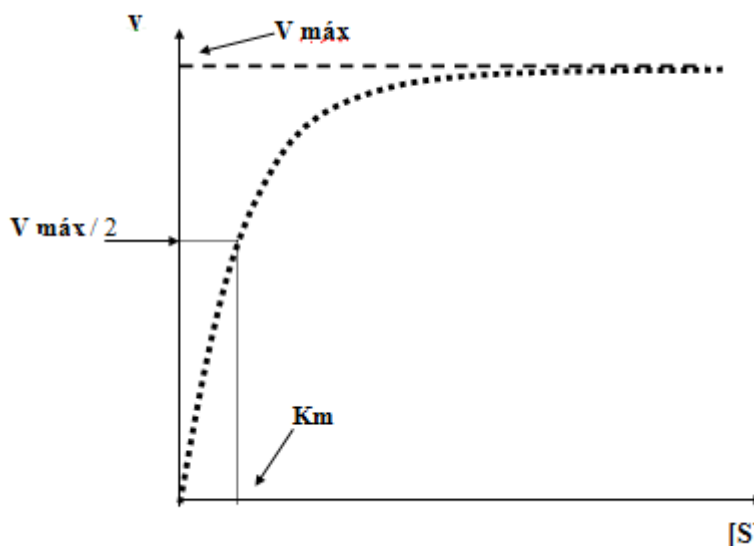
La actividad específica llega a ser máxima y constante cuando la enzima se encuentra al estado puro.

Cuando se tiene la enzima al estado puro y se conoce su peso molecular, se puede calcular su **actividad molar o número de recambio** que corresponde al número de moléculas (moles) de sustrato convertidos en producto por unidad de tiempo (minuto) por una molécula (mol) de enzima trabajando en condiciones de saturación de sustrato, lo que corresponde a la velocidad máxima en presencia de un mol de enzima.

$$\text{Índice de Cambio} = \frac{\text{moles de sustrato transformado/min.}}{\text{mol de enzima}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, y ellos deben ser tenidos en cuenta cuando se desea determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Entre dichos factores se encuentran: **concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia de inhibidores.**

Si se mide la actividad de una enzima a diferentes concentraciones de sustrato, inicialmente cuando las concentraciones de sustrato son bajas, la actividad aumenta rápidamente con los incrementos en la concentración de sustrato, pero a niveles más elevados de sustrato el incremento de la velocidad enzimática se va haciendo más lento, tendiendo a alcanzar un valor de actividad máximo, el cual no aumenta por más que se siga incrementando la concentración de sustrato. Este comportamiento queda expresado en la siguiente gráfica:



**Fig 1:** Representación gráfica de la actividad enzimática expresada como velocidad ( $v$ ) versus la concentración de sustrato ( $[S]$ ).

$V_{m\acute{a}x}$ : velocidad máxima

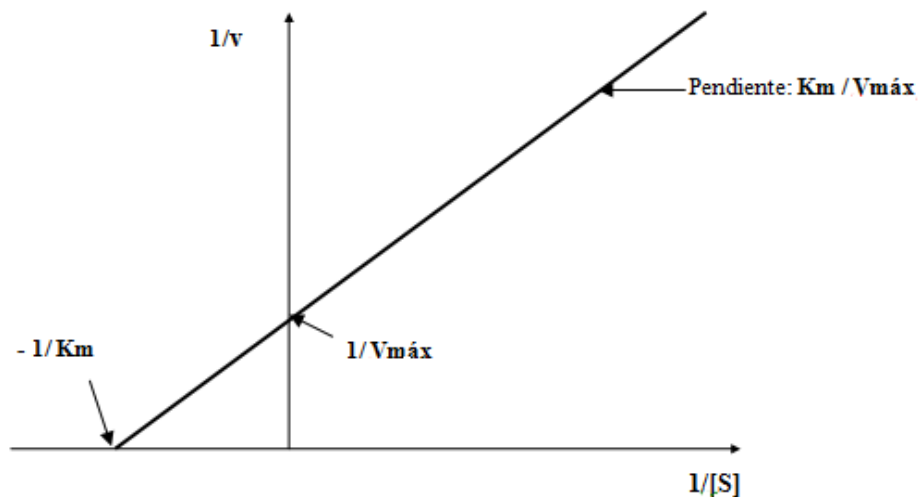
Michaelis y Menten establecieron una relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato mediante una constante llamada  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten), y dedujeron que la hipérbola que corresponde a la curva de saturación de una enzima por su sustrato puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Se puede definir  $K_m$  como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. En condiciones definidas de medio de reacción, pH, temperatura, etc.,  $K_m$  tiene un valor fijo para cada sustrato de una misma enzima, se expresa en unidades de concentración, y sirve para caracterizarla.

La ecuación de Michaelis-Menten puede ser transformada algebraicamente en ecuaciones equivalentes utilizables para la determinación práctica del valor de  $K_m$ . Un ejemplo de ello es la ecuación de Lineweaver-Burk, que resulta de realizar la inversa de la ecuación de Michaelis-Menten, y corresponde a la ecuación de una recta que no pasa por el origen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$



**Fig2:Ecuación de Lineweaver-Burk y su representación gráfica.**

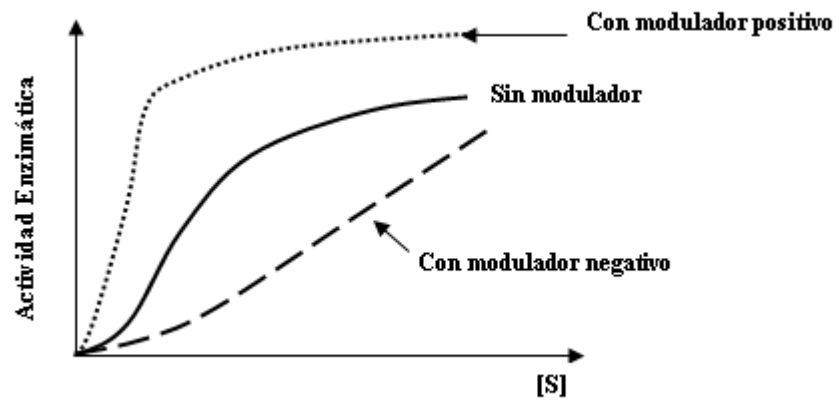
[S]: concentración de sustrato

v: velocidad enzimática

Además, la actividad de las enzimas en las células puede ser regulada por varios mecanismos. En casi todas las vías metabólicas existen una o más enzimas que actúan como reguladoras que pueden aumentar o disminuir su actividad de acuerdo a señales específicas. Dentro de este grupo de enzimas se pueden distinguir las **alostéricas y las reguladas por unión covalente**.

Las **enzimas alostéricas** no poseen una cinética Michaeliana y la gráfica de actividad vs concentración de sustrato ([S]) da una curva sigmoidea. En la estructura molecular de las enzimas alostéricas además del sitio catalítico existen otros sitios denominados reguladores, a los cuales se unen específicamente moléculas que ejercen acción activadora o inhibidora sobre la actividad enzimática. Estos agentes se llaman moduladores, modificadores o efectores alostéricos y pueden actuar de modo positivo o negativo.

Las enzimas alostéricas están constituidas por varias subunidades polipeptídicas entre las cuales existe algún tipo de comunicación, que hace que cuando un modulador positivo o negativo se une a ellas, ocurra un cambio de conformación que se transmite a las otras subunidades, de tal forma que favorece o impide la unión del sustrato al sitio activo, según se trate de un modulador positivo o negativo, respectivamente.



**Fig3:**Representación gráfica de la actividad enzimática de enzimas alostéricas versus la concentración de sustrato ( $[S]$ ) en presencia y ausencia de moduladores

Las **enzimas reguladas por modificación covalente** regulan su actividad por la unión o sustracción de grupos unidos covalentemente, por ejemplo de grupos fosfatos.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

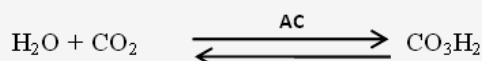
1) Un investigador descubre y purifica una enzima nueva generando la siguiente tabla de purificación:

Procedimiento	Proteína total (mg)	Actividad (Unidades)
Extracto crudo	20.000	4.000.000
Precipitación (sal)	5.000	3.000.000
Precipitación (pH)	4.000	1.000.000
Cromatografía de intercambio iónico	200	800.000
Cromatografía de tamaño	45	675.000

- De la información dada en la tabla calcular la actividad específica de la solución enzimática después de cada procedimiento de purificación.
- ¿Cuál de los procedimientos de purificación utilizados con esta enzima es el más efectivo (es decir, produce el máximo incremento en pureza)?
- ¿Cuál de los procedimientos de purificación es el menos efectivo?
- ¿Hay alguna indicación en esta tabla de que el enzima ya sea puro? ¿Qué más se podría hacer para conocer la pureza de la preparación enzimática?

2) El sabor dulce del maíz recién cosechado se debe a la gran cantidad de azúcar de los granos. Varios días después de la cosecha el maíz no es tan dulce debido a que el 50% del azúcar dulce del maíz se convierte en almidón durante el primer día después de la cosecha. Para mantener el sabor dulce del maíz fresco, se sumergen las espigas en agua hirviente durante unos minutos enfriándose después en agua fría. El maíz procesado de esta manera y mantenido en la heladera conserva su sabor dulce perfectamente. ¿Cuál es la base bioquímica de este proceso?

3) La anhidrasa carbónica (AC) presente en los glóbulos rojos, se halla entre las enzimas conocidas más activas. Posee un PM de 30.000 g y cataliza la hidratación reversible del  $\text{CO}_2$ , reacción importante en el transporte del  $\text{CO}_2$  desde los tejidos hasta los pulmones.



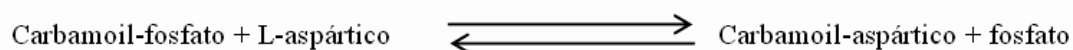
Si 10  $\mu\text{g}$  de anhidrasa carbónica pura catalizan la hidratación de 0.30 g de  $\text{CO}_2$  en 1 minuto a 37  $^\circ\text{C}$ , en las condiciones óptimas, calcúlese el número de recambio de la enzima.

- 4) Una enzima que cataliza la reacción  $S \longrightarrow P$ , se ensaya con las siguientes concentraciones de sustrato, indicándose también las velocidades iniciales.

Concentración inicial de [S]. Molar	Velocidad inicial ( $\mu\text{mol} / \text{l min}$ )
$1 \times 10^{-2}$	75.0
$1 \times 10^{-3}$	74.9
$1 \times 10^{-4}$	60.0
$7.5 \times 10^{-5}$	56.25
$6.26 \times 10^{-6}$	15.0

- a) Determinar el valor de  $K_m$  y la  $V_{\text{máx}}$  que se pueden conseguir con la concentración de la enzima utilizada.
- b) ¿Cuál sería la velocidad inicial con concentraciones de sustrato tales como:  $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$  y  $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ?
- c) ¿Cuál sería la velocidad inicial con una concentración inicial de  $[S] 10^{-4}$  si se duplica la concentración de enzima?

- 5) La enzima aspartatotranscarbamilasa cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidina:



En estudio cinético sobre esta enzima aislada de *E. coli*, utilizando aspártico como sustrato, en presencia de CTP 0.5 M y en ausencia del mismo, se obtuvieron los siguientes datos:

Aspártico (mmolar)	V <sub>0</sub> (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0.5 M
1	0,45	0,20
2	0,80	0,40
3	1,70	0,70
4	2,90	1,00
5	3,40	1,40
7	4,30	2,40
9	5,10	3,70
10	5,30	4,20
12	5,60	4,80
15	5,80	5,50
16	5,80	5,60
17	5,80	5,60

- a) Sin utilizar ninguna representación gráfica, estime el valor de Km.
- b) Calcule ese mismo parámetro utilizando la ecuación de Michaelis - Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre estas dos determinaciones? Justifique.
- c) ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático?
- 6) Aunque muchos animales carecen de las enzimas necesarias para efectuar la digestión de la celulosa (polisacárido insoluble), los rumiantes emplean la acción microbiana para digerir las hierbas y plantas con hojas que ingieren. A diferencia de la mayor parte de los animales, los rumiantes muestran una gran necesidad de cobalto en su nutrición. Sugiera una razón para la elevada necesidad de cobalto en la nutrición de los rumiantes.

## GUÍA DE ESTUDIO

### Enzimas

Clasificación. Cofactores enzimáticos.

Definiciones de Unidad de Enzima, Actividad Específica e Índice de Cambio.

Ecuación de Michaelis Menten: Determinación gráfica de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ :

- ¿En qué condiciones se alcanza  $V_{m\acute{a}x}$  en una reacción enzimática?
- ¿Qué importancia tiene la determinación del  $K_m$  de una enzima?
- Definición de  $K_m$ . Su importancia. ¿Qué factores modifican su valor?

Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática, pH óptimo.

Efecto de concentración de sustrato: Determinación de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .

### Enzimas alostéricas

¿Qué entiende por retroinhibición?

¿Qué propiedades tiene una enzima alostérica?

¿Cuál es el comportamiento de la enzima alostérica frente a concentraciones crecientes de sustrato?

¿Dónde se une el modulador o efector y cómo se modifica la actividad enzimática?

## T.P. DE AULA N° 2

### TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL

### FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

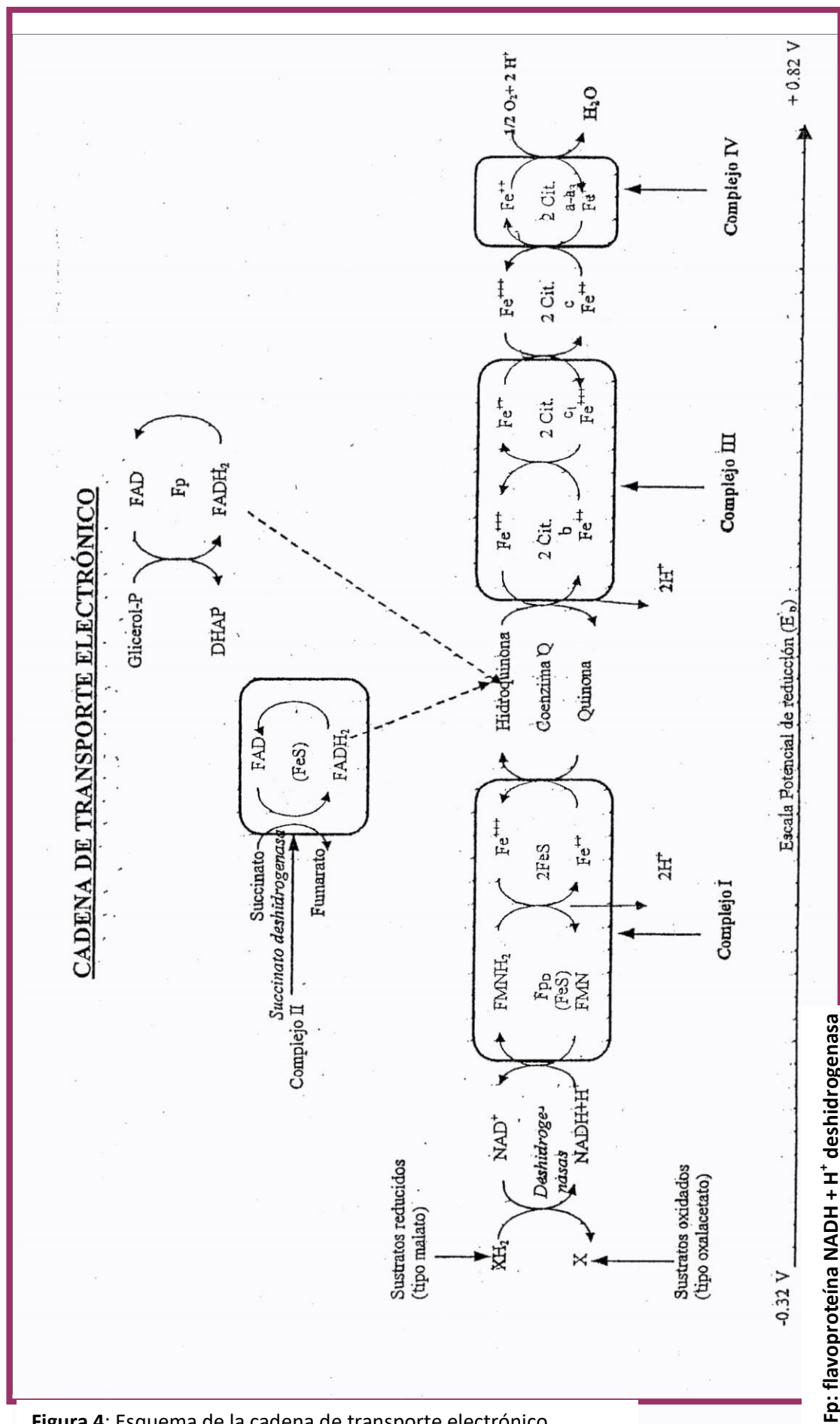
#### OBJETIVOS

- Describir el transporte de electrones mitocondrial, a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP por fosforilación oxidativa.
- Interpretar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.

#### INTRODUCCIÓN

En los sistemas vivos, el proceso por el cual se transfieren los electrones desde las biomoléculas de los nutrientes que se degradan por oxidación completa hasta el oxígeno, se denomina **respiración celular**. Este proceso, implica el pasaje de electrones a través de una serie de transportadores unidos a la membrana interna mitocondrial, los cuales son capaces de aceptar y donar uno o dos electrones en una secuencia llamada **transporte electrónico** o **cadena respiratoria mitocondrial**.

Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los alimentos, en energía química de enlaces del ATP. La mayor parte de la síntesis de ATP se realiza en condiciones aeróbicas, durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al Ciclo de Krebs, principalmente como acetil-CoA y también como otros intermediarios del ciclo, los cuales al ser oxidados hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O producen, a través de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (hidrógenos y electrones) que son transportados a través de la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial hasta el oxígeno, para formar agua.



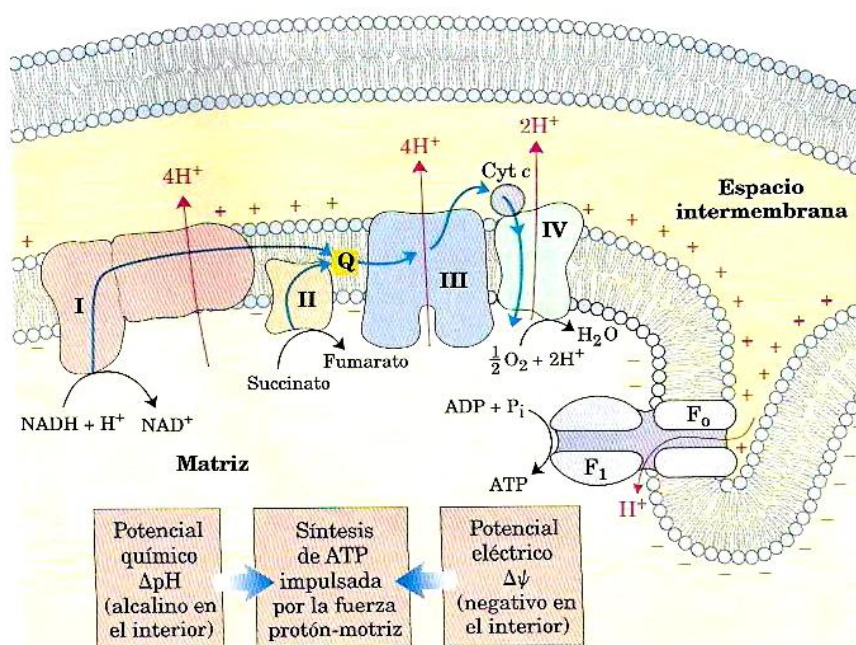
**Figura 4:** Esquema de la cadena de transporte electrónico

La energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar  $H^+$  desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, formándose un gradiente de concentración de  $H^+$ , que al ingresar a través del ATP sintasa  $F_1F_0$  proporcionan la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico ( $P_i$ ). Este proceso se denomina **fosforilación oxidativa**.

### Fosforilación oxidativa

La energía producida por la transferencia de electrones es aplicada a la síntesis de ATP.

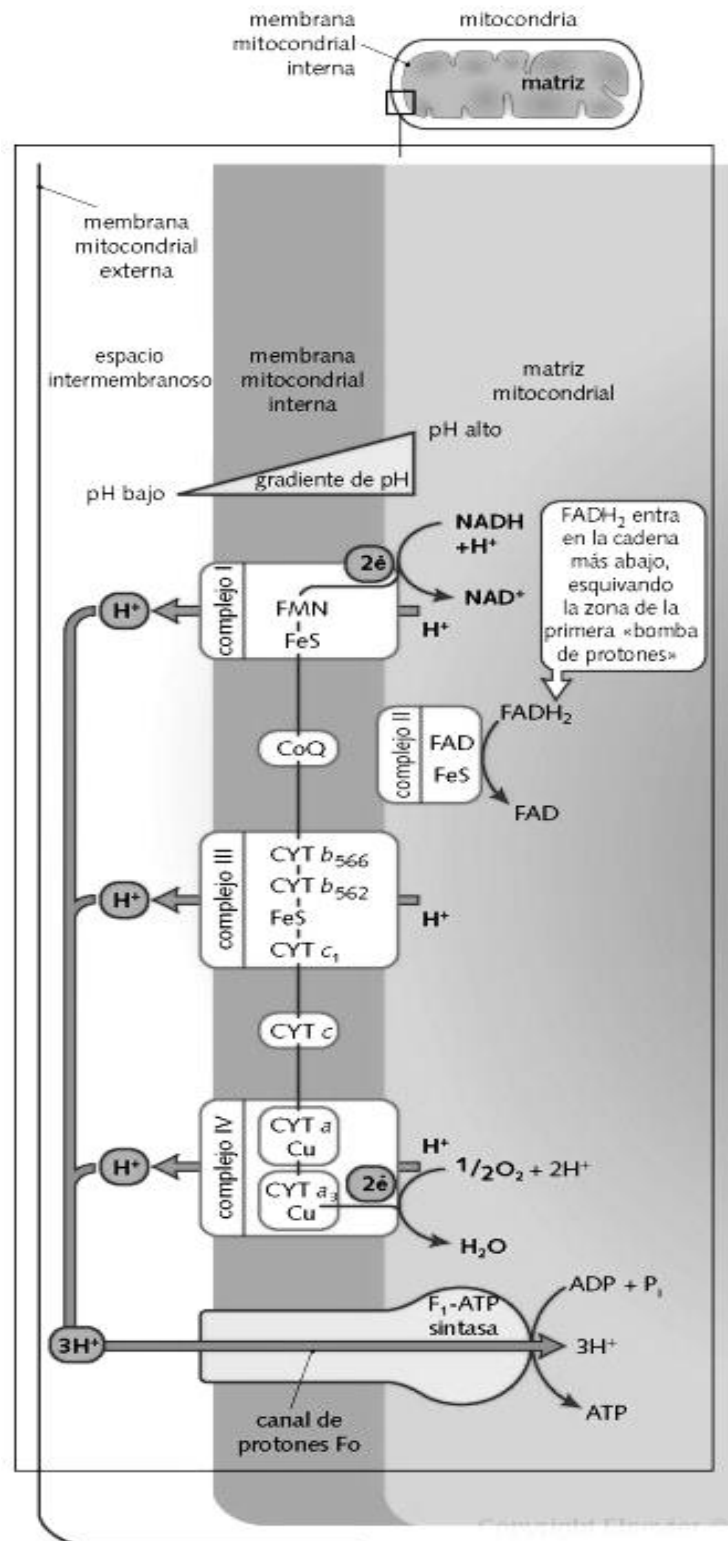
La teoría quimiosmótica sostiene que el proceso de transporte electrónico actúa como un sistema translocador de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana, originando un gradiente de protones y creando una diferencia de potencial eléctrico entre ambas caras. Como la membrana interna es impermeable a los protones, estos sólo la pueden atravesar por estructuras que permiten eludir la apolaridad de la capa. Estos sitios corresponden a la fracción proteica  $F_0$  del complejo  $F_1 - F_0$  (ATP sintasa). Dos protones ingresan a la proteína  $F_0$ , que provee un canal iónico a través de la bicapa lipídica y al llegar a  $F_1$ , se activa la ATP sintasa y se genera ATP. En la siguiente figura se muestra el pasaje de protones a través de la membrana y la síntesis de ATP.



**Figura 5:** Modelo quimiosmótico aplicado a las mitocondrias. Gradiente químico ( $\Delta pH$ ), gradiente eléctrico ( $\Delta \psi$ ), subunidades de la ATP sintasa ( $F_1$  y  $F_0$ ). Extraído de Lehninger, A.L., Nelson, D., Cox M. "Principios de Bioquímica", 2006.

Sustratos que se oxidan por  
deshidrogenasas NAD  
dependientes: Relación P/O = 3

Sustratos que se oxidan por  
deshidrogenasas FAD  
dependientes: Relación P/O = 2



**Figura 6:** Esquema de la fosforilación oxidativa asociada al transporte de electrones. Tomado de "Metabolismo y Nutrición". Benyon, S. HarcourtBrace (1998).

## Inhibidores

Algunos agentes actúan inhibiendo la transferencia de electrones impidiendo la síntesis de ATP.

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona	Insecticida	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la Coenzima-Q
Amital	Barbitúrico: induce el sueño	
Clorpromazina	Sedante	
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit b a cit c <sub>1</sub>
Cianuro		Inhiben la citocromo oxidasa
Monóxido de carbono		
Azida sódica		

Otros inhibidores bloquean directamente la fosforilación, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, la oxidación también se bloquea.

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de F <sub>0</sub>

## Desacoplantes

Son compuestos que desconectan el acoplamiento que existe entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, impidiendo la síntesis de ATP, sin inhibir el flujo de electrones hacia el O<sub>2</sub>. Ejemplos: 2,4-dinitrofenol y dicumarol.

Estos agentes son sustancias liposolubles que descargan el gradiente de protones formado por el transporte electrónico, haciendo regresar protones a través de la membrana interna, comportándose como ionóforos de protones. De esta forma, promueven la salida de protones a través de la membrana, disipando la fuerza motriz protónica e inhibiendo la síntesis de ATP.

### **Cociente Respiratorio**

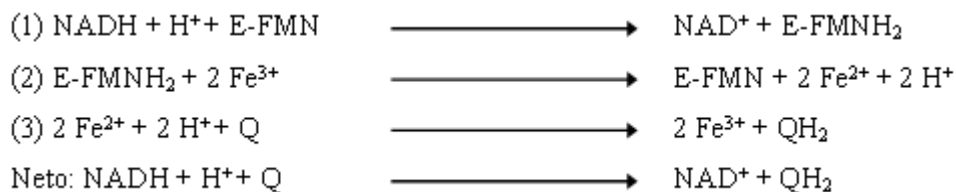
Los vegetales luego de ser recolectados continúan con el proceso de respiración produciendo  $\text{CO}_2$  y consumiendo oxígeno. Esta característica tiene gran importancia en la industria de alimentos ya que aquellos vegetales que tienen una gran actividad respiratoria, son más perecederos.

La respiración puede ser cuantificada según la cantidad de oxígeno que se consume o la cantidad de  $\text{CO}_2$  que se genera. El cociente respiratorio (QR) es útil para detectar cambios en los procesos metabólicos, y se define como la relación existente entre el volumen de  $\text{CO}_2$  liberado y el de  $\text{O}_2$  consumido durante un tiempo determinado. Un incremento en el QR durante la respiración indica un aumento en las reacciones de descarboxilación o una disminución en las de carboxilación.

En determinadas condiciones de conservación (por ej. refrigeración, atmósferas controladas) es posible disminuir la tasa respiratoria y prolongar considerablemente la vida útil como alimento de un vegetal fresco.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

- 1) Las deshidrogenasas dependientes del NADH de la cadena de transporte electrónico mitocondrial promueven la siguiente serie de reacciones de óxido-reducción:

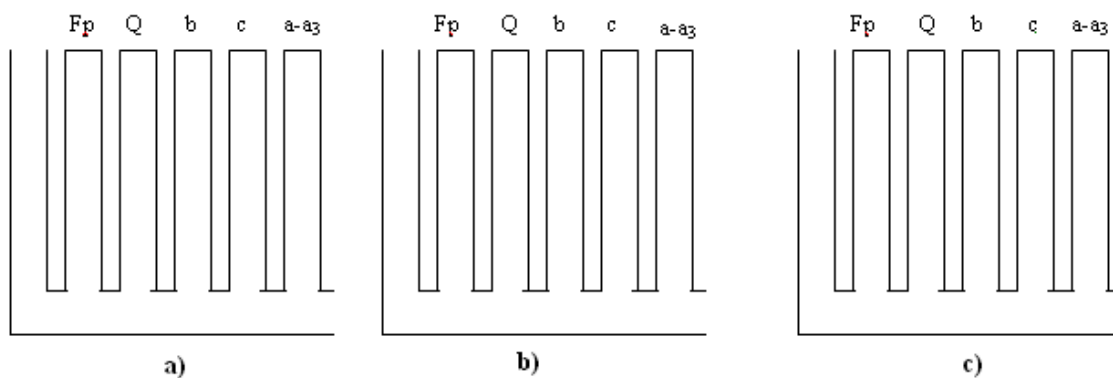


Identifique en cada una de las tres reacciones catalizadas por la deshidrogenasa del NADH:

- el dador de electrones o agente reductor;
- el aceptor de electrones o agente oxidante;
- el par conjugado redox.

- 2) El grado de reducción de cada transportador electrónico en la cadena respiratoria está determinado por las condiciones existentes en la mitocondria. Dibuje la analogía hidráulica apropiada con la cadena respiratoria, para cada una de las condiciones indicadas:

- Aporte abundante de NADH y de  $\text{O}_2$ .
- Aporte abundante de NADH y de  $\text{O}_2$ , pero se le añade antimicina A.
- Aporte abundante de NADH en ausencia de oxígeno.



- 3) La “grasa parda” es un tipo de tejido adiposo que es abundante en los animales que hibernan y en los niños, y que también está presente (aunque en baja proporción) en seres humanos adultos. Este tejido posee un alto contenido en mitocondrias (que le proporcionan una apariencia marrón), las cuales tienen una relación P/O menor que 1.

Luego de leer e interpretar el siguiente texto responda:

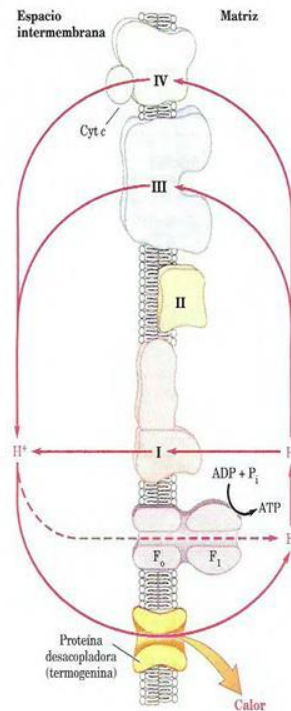
- ¿Qué papel fisiológico desempeñan las mitocondrias de este tejido?

b) ¿Qué diferencias hay entre las mitocondrias de este tejido y las de otros tejidos?

### Las mitocondrias desacopladas del tejido adiposo marrón producen calor

Existe una excepción notable e instructiva a la regla general de que la respiración se hace más lenta cuando el suministro de ATP es adecuado. En la mayoría de mamíferos, incluido el ser humano, los recién nacidos tienen un tipo de tejido adiposo denominado **tejido adiposo marrón** en el que la oxidación de combustibles no sirve para producir ATP sino para generar calor y mantener caliente al recién nacido. Este tejido especializado es marrón debido a la presencia de grandes cantidades de mitocondrias y, por consiguiente, de citocromos cuyos grupos hemo absorben fuertemente la luz visible.

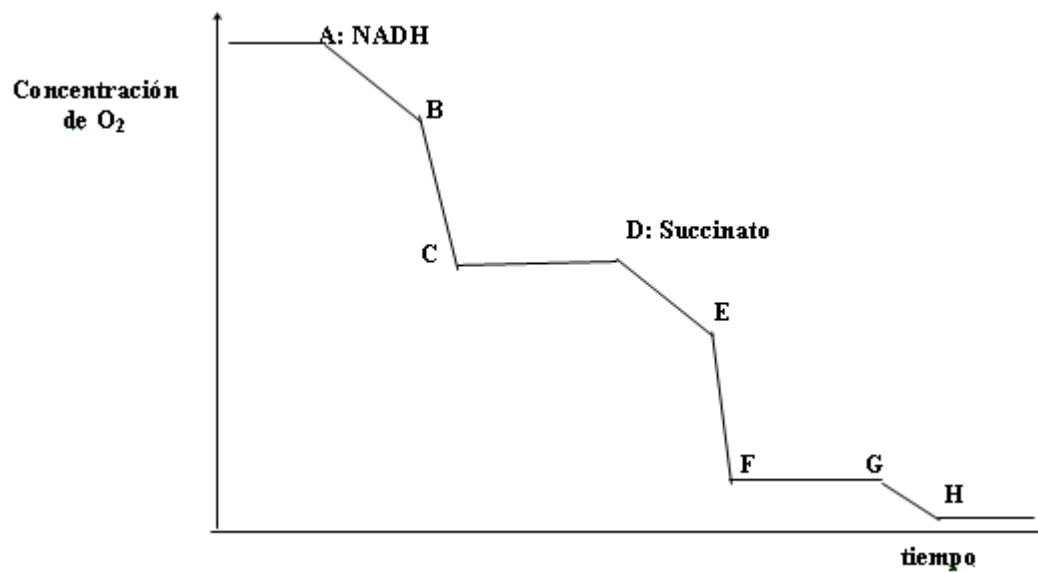
Las mitocondrias del tejido adiposo marrón son igual que las demás mitocondrias de células de mamíferos en todos los aspectos, salvo que tienen una proteína particular en su membrana interna. La **termogenina**, llamada también **proteína desacopladora** (Tabla 19-4), proporciona un paso para que los protones vuelvan a la matriz sin pasar por el complejo  $F_0F_1$  (Fig. 19-30). El resultado de este cortocircuito de protones es que la energía de oxidación no se conserva mediante la formación de ATP sino que se disipa en forma de calor, lo que contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal del recién nacido. Los animales hibernantes también dependen de las mitocondrias desacopladas del tejido adiposo marrón para generar calor durante sus largos períodos de letargo (véase Recuadro 17-1).



Extraído de Lehninger, A.L., Nelson, D., Cox M.  
"Principios de Bioquímica", 2006

4) El gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a 30°C y a pH 7,5. Caracterice cada uno de los compuestos agregados (B,C, E, F, G, H). Justifique brevemente el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de  $O_2$ .

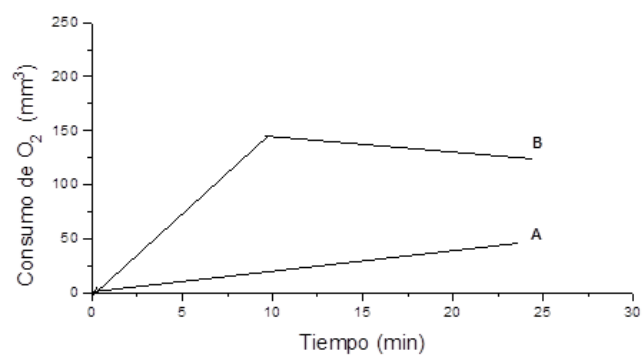
**B:** ADP + Pi u Oligomicina **E:** 2,4-DNF u Oligomicina **G:** Malonato o Succinato **C:** Rotenona o Antimicina **F:** Malonato o Succinato **H:**  $CN^-$  o Amital



5) El consumo de  $O_2$  fue medido en dos vasos de Warburg que contenían lo siguiente:

VASO A	VASO B
mitocondrias de hígado de rata	ídem A
21 $\mu$ moles de $\alpha$ -cetoglutarato	+ Hexoquinasa de levadura
30 $\mu$ moles de fosfato	+ 35 $\mu$ moles de glucosa
ATP, citocromo c y $MgSO_4$	

Con los resultados obtenidos se graficaron las siguientes curvas. Explique las diferentes gráficas.



## PROBLEMAS COMPLEMENTARIOS

1) Luego de leer e interpretar el siguiente párrafo responda:

- ¿Qué ruta respiratoria alternativa poseen los vegetales? Identifique la principal enzima involucrada y su función (Fig. 2, pág. siguiente).
- ¿Qué ventaja adaptativa implica la *termogénesis* para las plantas de la familia Aráceas?
- Investigue las ventajas que implica la presencia de esta ruta respiratoria adaptativa en otros organismos.

### Calor, plantas malolientes y rutas respiratorias alternativas

Muchas plantas con flores atraen a insectos polinizadores liberando moléculas olorosas que mimetizan las fuentes de alimentación naturales de los insectos o los sitios potenciales para la puesta de los huevos. Las plantas polinizadas por moscas o escarabajos que normalmente se alimentan en estiércol o en carroña o hacen la puesta de los huevos utilizan a veces compuestos malolientes para atraerlos.

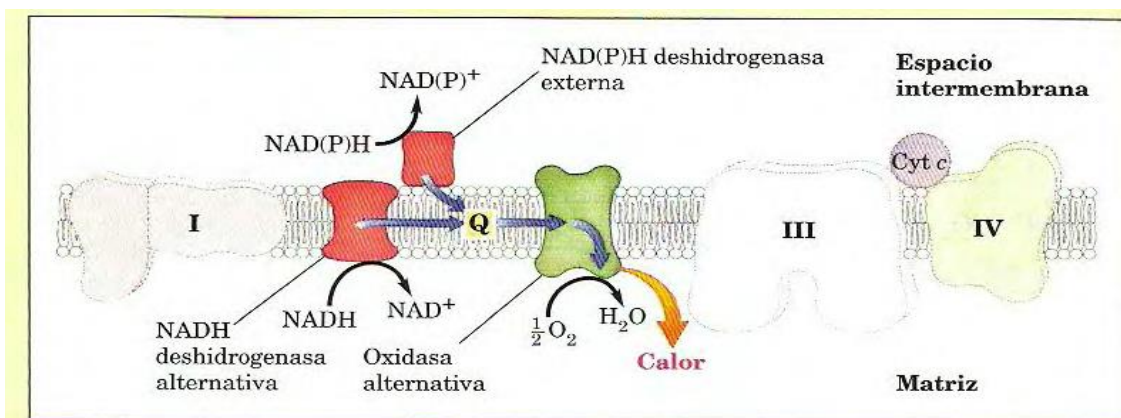
Una de las familias de plantas malolientes es la de las Aráceas, que incluye filodendros, un tipo de lirios y las coles mofeta. Estas plantas tienen flores pequeñas agrupadas densamente en una estructura erecta (espádice) y están rodeadas por una hoja modificada (espata). La espádice libera olor a carne podrida o estiércol. Antes de la polinización la espádice se calienta, en algunas especies hasta 20-40 °C por encima de la temperatura ambiente. La producción de calor (termogénesis) ayuda a evaporar las moléculas olorosas para que se dispersen mejor y, debido a que tanto la carne podrida como el estiércol están generalmente calientes como consecuencia del metabolismo hiperactivo de los microorganismos carroñeros, el calor por sí mismo también podría atraer a los insectos. En el caso de la col mofeta oriental (Fig. 1), que florece a finales del invierno o a principios de la primavera cuando la nieve todavía cubre el suelo, la termogénesis permite que la espádice crezca a través de la nieve.

¿Cómo calienta una col mofeta oriental su espádice? Aunque las mitocondrias de plantas, hongos y eucariotas unicelulares tienen sistemas de transferencia de electrones que son básicamente los mismos que los de animales, también tienen una vía respiratoria alternativa. En esta vía, una  $\text{QH}_2$  oxidasa resistente al cianuro transfiere directamente los electrones desde la ubiquinona al oxígeno, evitando los dos pasos de translocación de protones de los Complejos III



FIGURA 1 Col mofeta oriental.

y IV (Fig. 2). La energía que se podría haber conservado en forma de ATP se libera, en cambio, en forma de calor. Las mitocondrias de plantas también tienen una NADH deshidrogenasa, insensible a la rotenona, inhibidora del Complejo I (véase Tabla 19-4), que transfiere electrones desde el NADH de la matriz directamente a la ubiquinona, sin utilizar el Complejo I ni el bombeo protónico asociado. Las mitocondrias de plantas tienen además otra NADH deshidrogenasa, en la cara externa de la membrana interna, que transfiere electrones desde el NADPH o NADH del espacio intermembrana a la ubiquinona, igualmente sin utilizar el Complejo I. De este modo, cuando los electrones pasan por la vía respiratoria alternativa gracias a la NADH deshidrogenasa insensible a la rotenona, a la NADH deshidrogenasa externa o a la succinato deshidrogenasa (Complejo II) y pasan al  $\text{O}_2$  a través de la oxidasa alternativa resistente al cianuro, la energía no se conserva como ATP, sino que se libera en forma de calor. Una col mofeta puede utilizar el calor para fundir la nieve, producir mal olor o atraer a escarabajos y moscas.



**FIGURA 2** Transportadores de electrones de la membrana interna de las mitocondrias de plantas. Los electrones pueden fluir a través de los Complejos I, III y IV, al igual que en las mitocondrias de animales, o a través de transportadores alternativos específicos de plantas mediante las vías mostradas con flechas azules.

Extraído de Lehninger, A.L., Nelson, D., Cox M. "Principios de Bioquímica", 2006

- 2) La rotenona es una sustancia tóxica, que inhibe fuertemente a las deshidrogenasas del NADH de las mitocondrias. La antimicina A es un antibiótico tóxico que inhibe fuertemente la oxidación del citocromo b.
- a) Emita una hipótesis de por qué la ingestión de la rotenona es letal para algunas especies de insectos y de peces.
- b) Suponiendo que la rotenona y la antimicina A son igualmente eficaces en el bloqueo de sus sitios respectivos en la cadena respiratoria, ¿cuál de ellas sería un veneno más potente?

## GUÍA DE ESTUDIO

### Transporte electrónico

- . Localización de las enzimas. Deshidrogenasas NADH y FADH<sub>2</sub> dependientes, ubiquinona, citocromos. Clases de enzimas y transportadores. Complejos.
- . ¿Cómo están ubicados respecto al valor de su potencial de reducción?
- . ¿A qué nivel de la cadena actúan algunos inhibidores? ¿En qué estado (oxidado o reducido) se encuentran los intermediarios cuando actúan los inhibidores?
- . ¿Cómo actúan los inhibidores del transporte y los ionóforos? Ejemplos de cada uno de ellos.
- . Relación P/O para sustratos que se oxidan por deshidrogenasas NADH y FADH<sub>2</sub> dependientes.

**Fosforilación oxidativa:** Teoría quimiosmótica.

Acción de los desacoplantes de la fosforilación oxidativa:

. ¿Cómo actúan las sustancias desacoplantes? En presencia de un desacoplante ¿Qué ocurriría respecto a: la concentración de  $P_i$ , la velocidad de oxidación, transporte de electrones, producción de calor y concentración de ADP mitocondrial?

. Cuando un sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee FAD como grupo prostético ¿Cómo es la relación P/O en ausencia de inhibidores, en presencia de cada uno de los inhibidores conocidos por separado o en presencia de desacoplantes?

¿Qué ocurriría si en el caso anterior el sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee NAD como coenzima?